

09/423905  
PCT/JP 99/01373

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

02.04.99  
EAKU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年 3月19日

REC'D 28 MAY 1999

出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第070914号

WIPO PCT

出 願 人  
Applicant (s):

雪印乳業株式会社

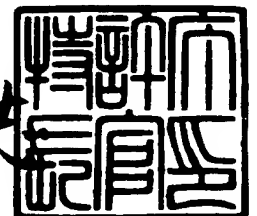
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 5月14日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3028436

【書類名】 特許願

【整理番号】 YTP97050

【提出日】 平成10年 3月19日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【発明の名称】 敗血症予防及び／又は治療剤

【請求項の数】 2

【発明者】

    【住所又は居所】 滋賀県草津市野路町桜ヶ丘4-3-6

    【氏名】 谷 徹

【発明者】

    【住所又は居所】 滋賀県大津市萱野浦22-46-607

    【氏名】 近藤 浩之

【特許出願人】

    【識別番号】 000006699

    【氏名又は名称】 雪印乳業株式会社

    【代表者】 石川 哲郎

【手数料の表示】

    【納付方法】 予納

    【予納台帳番号】 030166

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 敗血症予防及び／又は治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 TCF-II を有効成分とする敗血症予防及び／又は治療剤。

【請求項 2】 敗血症が、熱傷、手術、癌、後天性免疫不全症候群、放射線治療、化学療法、長期中心静脈栄養からなる群から選択される 1 以上の要因に基づき発症したものである、請求項 1 記載の敗血症予防及び／又は治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、腫瘍細胞障害因子 (Tumor Cytotoxic Factor-II ; TCF-II) を有効成分とする敗血症予防及び／又は治療剤に関する。本発明により、感染症、熱傷、手術、癌、後天性免疫不全症候群 (AIDS)、放射線治療、化学療法、長期中心静脈栄養 (TPN) からなる群から選択される 1 以上の要因に基づき発症した敗血症に対する優れた予防及び／又は治療剤が提供され、医薬として有用である。

【0002】

【従来の技術】

一般に敗血症は、体の組織あるいは臓器のどこかに細菌感染巣があり、その病巣から絶えずあるいは断続的に、細菌あるいはその産物が流血中に侵入し起こす重症全身性感染症である。敗血症は、例えば悪性腫瘍、白血病、悪性リンパ腫、後天性免疫不全症候群 (AIDS)、膠原病、腎不全、肝疾患、脳血管障害、糖尿病などの基礎疾患を持った患者、高齢者、未熟児といった液性免疫不全、細胞性免疫不全を含めた抵抗力の減弱した宿主が副腎ステロイドや抗腫瘍剤といった化学療法、コバルト照射といった放射線治療、または留置カテーテル、血液透析、臓器移植、心臓手術などの処置、手術を行った場合にそれらが誘因となり発症する。近年、各種有力な抗生物質が開発され、敗血症に対する治療が行われてはいるものの、ペニシリンあるいはメチシリン耐性黄色ブドウ状球菌といった各種抗生物質耐性菌の出現を招き、依然として敗血症全体の致命率は約 25% で、かな

りの患者が敗血症のために毎年死亡している。

【0003】

敗血症の原因菌としては、上記各種抗生物質耐性菌以外にも腸レンサ球菌、グラム陰性桿菌である大腸菌、緑膿菌、クレブシエラ、プロテウスなどが主なものとして挙げられている。このうちグラム陰性桿菌による敗血症では、初期には高熱、悪寒戦慄、頻脈、血圧軽度低下、末梢抵抗低下、心拍出量増加、過換気と呼吸アルカローシス、高乳酸血症などの症状を呈し、心不全に至ることもある。その後、血圧と心拍出量が低下し、代謝性アシドーシス、意識障害、四肢冷感、低血糖などを呈して重篤な状態に陥り、死に至ることもあり、これら敗血症に対する治療の重要性が唱えられている。

【0004】

一方、細菌の生体内への侵入経路には大きく分けて2つ考えられている。輸液や補液のための静脈内留置カテーテルや穿刺針といったものが感染門戸となる外因性の場合と、腸管を始めとするヒトの身体に広く分布する常在菌が腸管等より侵入する内因性の場合がある。この腸管からの細菌あるいは細菌産生物の移行をバクテリアルトランスロケーションまたはエンドトキシントランスロケーションと呼び、敗血症に至る引き金として注目されている。このような腸管からの細菌や細菌産生物の移行は、熱傷や大手術等の高度侵襲時あるいは手術後患者や意識障害患者への長期TPN施行時に認められ、大きな問題となっている。

【0005】

これらバクテリアルトランスロケーションを含めた敗血症の治療には、抗生物質が第一選択され、一定の効果は認められているものの、副作用、耐性菌の出現さらにはショック症状に対する効果といった点で、抗生物質には限界があると考えられている。また、輸液による栄養の補強やγ-グロブリン製剤等による治療も行われているが宿主の免疫機能の回復を目的としたものであり、あくまでも抗生物質による治療の補助的な治療法に止まっており、効果的な治療法がないのが実状である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、敗血症に対する治療薬物を鋭意探索した結果、腫瘍細胞障害因子と知られているTCF-IIが、敗血症に対し優れた予防及び治療効果を有することを見出した。従って本発明は、TCF-IIを有効成分とする、熱傷、手術、癌、後天性免疫不全症候群(AIDS)、放射線治療、化学療法、長期中心静脈栄養(TPN)からなる群から選択される1以上の要因に基づき発症した敗血症の予防及び／又は治療剤を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明により、TCF-IIを有効成分とする敗血症予防及び／又は治療剤が提供される。本発明薬剤は敗血症、特に感染症、熱傷、手術、癌、後天性免疫不全症候群(AIDS)、放射線治療、化学療法、長期中心静脈栄養(TPN)からなる群から選択される1以上の要因に基づき発症した敗血症に対する予防及び／又は治療剤として有用である。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の有効成分であるTCF-IIは、ヒト線維芽細胞由来の公知の蛋白質であり、下記の特性を有する。

i) 分子量 (SDS電気泳動法)

非還元下 : 78,000±2,000 又は74,000±2,000

還元下 : 52,000±2,000 (共通バンドA)

30,000±2,000 (バンドB)

26,000±2,000 (バンドC)

ii) 等電点 : 7.4 ~ 8.6

上記TCF-IIは、ヒト線維芽細胞培養液を濃縮しイオン交換体に吸着させ、その溶出液をアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製する方法(WO 90/10651号公報)、或いは遺伝子工学的的手法(WO 92/01053号公報)によって得られる。

【0009】

本発明の有効成分であるTCF-IIは、ヒト線維芽細胞IMR-90由来のものをを用いることが可能であり、又、WO90/10651号公報に記載された遺伝子配列に基づいて、微生物や他の細胞により遺伝子組換え操作により生産されたものでもよい。又、WO92/01053号公報に開示された遺伝子工学的手法により得られたものをを用いてもよい。この時、宿主細胞又は微生物の違いによる糖鎖の異なったものや、糖鎖の結合していないものであっても使用可能であるが、好ましくは糖鎖の結合しているものをを用いる。これらの方法により得られたTCF-IIは、通常の単離精製法によってさらに濃縮、精製することができる。例えば、有機溶媒による沈殿法、塩析、ゲル濾過、モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマト、電気泳動法等が挙げられる。モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトによる精製は、特開平5-97号公報に開示されているモノクローナル抗体を用いて精製することができる。得られた精製TCF-IIは、凍結乾燥あるいは凍結保存することができる。その他、TCF-IIと同様の活性を有するものであれば、本発明と同様の薬剤として利用可能である。例えば、TCF-II蛋白質と5アミノ酸の違いを有する蛋白質である肝細胞増殖因子(HGF; 特開昭63-22526号)、あるいは精製Scatter Factor(SF; Gherardi and Stocker, Nature, 346, 228 (1990))などが挙げられる。

【0010】

本発明の敗血症予防及び／又は治療剤は、注射剤として静脈、筋肉内、あるいは皮下より投与することができる。これらの製剤は公知の製剤学的製法に準じ製造され、必要に応じpH調整剤、緩衝剤、安定化剤等を添加することができる。本発明の製剤を患者に投与する場合、投与患者の症状の程度、健康状態、年齢、体重等の条件によって異なり、特に限定されないが、成人1日当たり精製TCF-IIとして0.6mg～600mg、好ましくは6mg～60mgを含有する製剤を1日1回若しくはそれ以上投与すれば良い。

【0011】

【実施例】

以下の実施例をもって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示する

のみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

【0012】

【製造例1】

#### TCF-IIの精製

WO90/10651号公報に開示された方法、及び東尾らの方法 (Higashio, K. et al, B.B.R.C., vol.170, pp397-404 (1990)) に準じて細胞を培養し、精製 TCF-II を得た。即ち、ヒト線維芽細胞 IMR-90 (ATCC CCL-186) を 5% 仔牛血清を含む DMEM 培地 100 ml を入れたローラーボトルに  $3 \times 10^6$  個移植し、0.5~2 回転/分の回転速度で回転させながら 7 日間培養を続けた。総細胞数が  $1 \times 10^7$  個になったところでトリプシンにより細胞を剥離し細胞をボトル底面に集め、5~9 メッシュのセラミック 100 g (東芝セラミック社) を殺菌して投入し、24 時間静置して培養した。その後、上記培養液を 500 ml 加え、培養を継続した。7~10 日ごとに培地を全量回収し、新鮮培地を補給した。このようにして 2 ヶ月間生産を継続し、ローラーボトル一本当たり 4 L の培養液を回収した。このようにして得た培養液当たりの比活性は  $32 \mu\text{g/ml}$  であった。培養液 750 L をメンブランフィルター (MW6000 カット; アミコン社) 処理により UF 濃縮し、CMセファデックス C-50 (ファルマシア社)、Con A セファロース (ファルマシア社)、Mono S カラム (ファルマシア社)、ヘパリンセファロース (ファルマシア社) による 4 段階のクロマト精製を行い、精製 TCF-II を得た。

【0013】

【製造例2】

#### 遺伝子組換え TCF-II の生産

WO92/01053号公報に開示された方法に従い、TCF-II 遺伝子を組み込んだ細胞を培養し、精製 TCF-II を得た。形質転換ナマルワ (Nawalwa) 細胞を培養し、培養液 20 L を得た。この培養液を CM-セファデックス C-50 クロマト (ファルマシア社)、Con-A セファロース CL-6B クロマト (ファルマシア社)、Mono S カラム (ファルマシア社) を装着した HPLC の順に処理を行い、約 11 mg の精製 TCF-II を得た。

【0014】

【製造例3】

TCF-II製剤の製造

実施例1及び2により得られたTCF-IIの注射剤の製造例を示す。

- |     |           |            |
|-----|-----------|------------|
| (1) | TCF-II    | 20 $\mu$ g |
|     | ヒト血清アルブミン | 100 mg     |

上記組成をpH6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

【0015】

- |     |           |            |
|-----|-----------|------------|
| (2) | TCF-II    | 40 $\mu$ g |
|     | ツイーン80    | 1 mg       |
|     | ヒト血清アルブミン | 100 mg     |

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

【0016】

- |     |        |            |
|-----|--------|------------|
| (3) | TCF-II | 20 $\mu$ g |
|     | ツイーン80 | 2 mg       |
|     | ソルビトール | 4 g        |

上記組成をpH6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

【0017】

- |     |        |            |
|-----|--------|------------|
| (4) | TCF-II | 40 $\mu$ g |
|     | ツイーン80 | 1 mg       |
|     | グリシン   | 2 g        |

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

【0018】

- |     |        |            |
|-----|--------|------------|
| (5) | TCF-II | 40 $\mu$ g |
|     | ツイーン80 | 1 mg       |



ソルビトール 2 g

グリシン 1 g

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を 20 ml に調製し、滅菌後バイアル瓶に 2 ml ずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

【0019】

(6) TCF-II 20  $\mu$ g

ソルビトール 4 g

ヒト血清アルブミン 50 mg

上記組成を pH 6.03 のクエン酸緩衝液に溶解し全量を 20 ml に調製し、滅菌後バイアル瓶に 2 ml ずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

【0020】

(7) TCF-II 40  $\mu$ g

グリシン 2 g

ヒト血清アルブミン 50 mg

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を 20 ml に調製し、滅菌後バイアル瓶に 2 ml ずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

【0021】

(8) TCF-II 40  $\mu$ g

ヒト血清アルブミン 50 mg

上記組成を pH 6.03 のクエン酸緩衝液に溶解し全量を 20 ml に調製し、滅菌後バイアル瓶に 2 ml ずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

【0022】

【実施例 1】

盲腸穿刺敗血症ラットに対する TCF-II 投与の効果

SD 系雄性ラット 7 週齢を用い、敗血症モデルは盲腸への 22 G 注射針による 1 回穿刺により作成した。敗血症モデル作成 48 時間前に、溶媒のみを投与する対照群（溶媒投与群）と TCF-II を投与する TCF 投与群の 2 群に分け、12 時間ごとに 5 回、静脈内に溶媒あるいは TCF-II を投与した。TCF-II の投与は 1 回当たり 1000  $\mu$ g/kg とした。敗血症モデル作成後 2 日目までの生

生存率変化の結果を図1に示す。この結果、2日目における生存率は溶媒投与群と比較して、TCF投与群で有意に高く、TCF-II投与により敗血症ラットの生存率が有意に上昇した。即ち、TCF-IIは敗血症発症後の生存率を著しく改善することが認められた。

【0023】

【実施例2】

LPS誘導バクテリアルトランスロケーションに対するTCF-II投与の効果

ICR雄性マウス7週齢を用い、LPSを静脈内に5mg/kg投与した。LPS投与30時間前に、溶媒のみを投与する対照群（溶媒投与群）とTCF-IIを投与するTCF投与群の2群に分け、12時間ごとに3回、静脈内に溶媒あるいはTCF-IIを投与した。TCF-IIの投与は1回当たり200 $\mu$ g/kgとした。LPS投与24時間後の腸間膜リンパ節における検出細菌数の結果を図2に示す。溶媒投与群と比較して、TCF投与群で検出細菌数は有意に低く、TCF-II投与により、LPS投与によって誘導される腸管からの菌の移行が有意に抑制された。即ち、TCF-IIは敗血症の引き金となるバクテリアルトランスロケーションに対しての生存率を著しく改善することが認められた。

【0024】

【発明の効果】

本発明により、TCF-IIを有効成分とする敗血症予防及び／又は治療剤が提供される。本発明薬剤は敗血症、特に感染症、熱傷、手術、癌、後天性免疫不全症候群（AIDS）、放射線治療、化学療法、長期中心静脈栄養（TPN）からなる群から選択される1以上の要因に基づき発症した敗血症に対する予防及び／又は治療剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 TCF-IIの盲腸穿刺敗血症モデルに対する効果を示す。

【符号の説明】

●：溶媒投与群

■：TCF-II投与群

【図2】 TCF-IIのLPS誘導バクテリアルトランスロケーションに対する効果を示す。

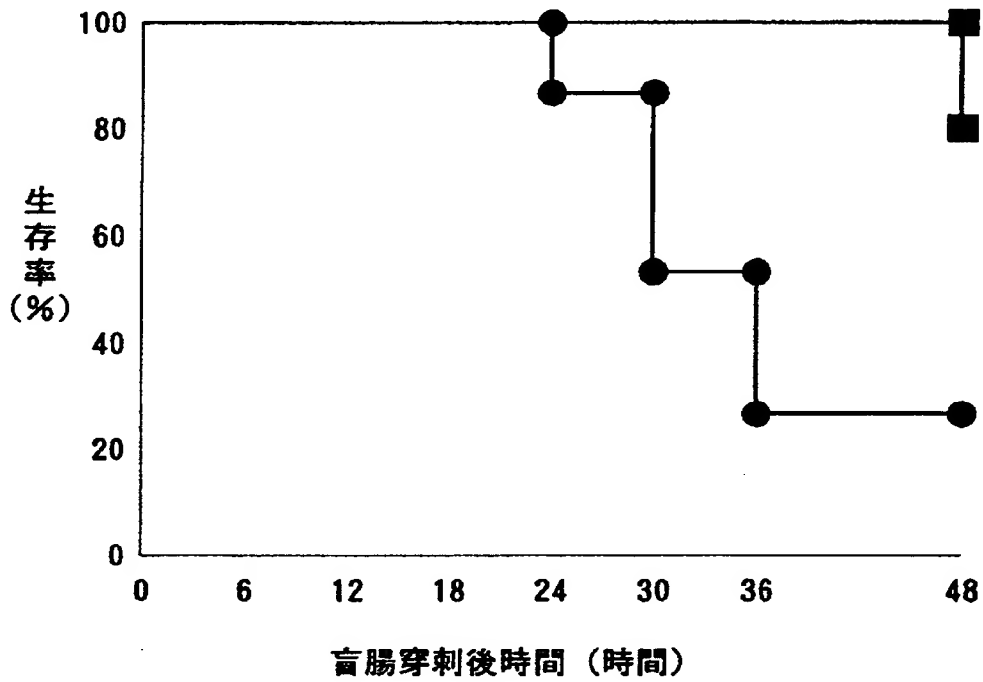
【符号の説明】

□：溶媒投与群

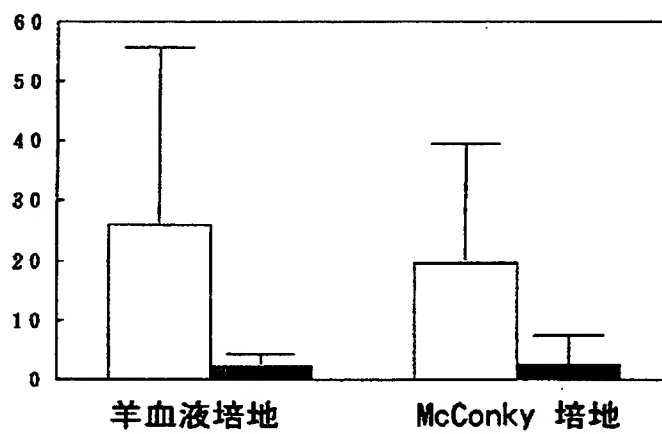
■：TCF-II投与群

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 敗血症予防及び／又は治療剤の提供。

【解決手段】 腫瘍細胞障害因子 (Tumor Cytotoxic Factor-II ; T C F - II ) を有効成分とする敗血症予防及び／又は治療剤。特に感染症、熱傷、手術、癌、後天性免疫不全症候群 (A I D S)、放射線治療、化学療法、長期中心静脈栄養 (T P N) からなる群から選択される 1 以上の要因に基づき発症した敗血症に対する優れた予防及び／又は治療剤。

【効果】 敗血症予防及び／又は治療剤として、医薬として有用。

【選択図】 なし

特平 10-070914

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000006699

【住所又は居所】

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

【氏名又は名称】

雪印乳業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006699]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
氏 名	雪印乳業株式会社

